

Wachstum von MCAF - Tumortransplantaten
bei immunisierten Mäusen

von
Hans Mosberg
aus
Schwenningen

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0055

Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie und Rheumatologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. Kalden

Wachstum von MCAF - Tumortransplantaten bei immunisierten Mäusen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hans Mosberg
aus
Schwenningen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. H. Warnatz
Korreferent: Prof. Dr. J. R. Kalden
Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1981

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite 1
Methoden und Material	Seite 3
Tiere	Seite 3
Zelllinien	Seite 3
Antigenpräparation	Seite 4
Immunisierung der Mäuse	Seite 4
Ergebnisse	Seite 6
Diskussion	Seite 8
Abbildungen, Tabellen	Seite 10
Zusammenfassung	Seite 14
Literaturverzeichnis	Seite 15

Danksagung

Lebenslauf

Einleitung

Die Versuche beschäftigen sich mit der Immunisierung gegen Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkome, im folgenden als MCAF bezeichnet.

Mäuse stoßen MCAF-Transplantate ab, wenn sie vorher mit Tumorzellen immunisiert worden sind (6). Die Produktion zytotoxischer Lymphozyten wurde durch in vivo oder in vitro Immunisierung angeregt. Hierfür wurde die Existenz tumorassoziierter Antigene verantwortlich gemacht (2,3,5,8,12,15,16).

In vivo Experimente zeigten, daß die Regression von MCAF-Transplantaten nur durch Immunisierung mit intakten MCAF-Zellen erreicht werden kann, nicht jedoch durch Immunisierung mit löslichen Antigenen, die aus der Tumor-Zellmembran isoliert wurden (7,10,14). Immunisierung gegen lösliche Membrant Antigene führte eher zur Beschleunigung des Tumorwachstums und zur Verkürzung der Überlebenszeit der Empfängertiere, ein Phänomen, das als Enhancement bezeichnet wird (4,9,11). Die molekulare Existenz tumorassoziierter Antigene in der MCAF-Zellmembran, die für die Induktion und den Effekt der Tumorabwehrmechanismen verantwortlich sind, ist bisher nicht endgültig bewiesen.

In den folgenden Experimenten wurden Mäuse gegen syngene MCAF3-Antigene immunisiert.

Folgende Antigene wurden eingesetzt:

1. Intakte, hitzebehandelte MCAF-Tumorzellen
2. Aus MCAF-Tumorzellen extrahierte lösliche Oberflächenmembran-Proteine

3. Der obengenannte Antigenextrakt, jedoch vernetzt mit Glutaraldehyd und damit unlöslich gemacht.

Der Effekt der Immunisierung wurde durch Feststellen des Größenwachstums von MCAF-Transplantaten auf immunisierte Tiere überprüft.

Das Ziel der Experimente war es festzustellen, ob Tumorabwehrmechanismen durch Immunisierung mit löslichen oder unlöslich gemachten Membranantigenen aus Tumorzellen ausgelöst werden können.

Methoden und Material

Tiere:

Für die Versuche wurden ausschließlich 6 bis 10 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Die Tiere entstammten einer im eigenen Hause weitergezüchteten Linie des syngenen Stammes C 57 Bl 6 aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover.

Zelllinien:

Die MCAF3-Zelllinie wurde ursprünglich durch subkutane Injektion von Methylcholanthren bei C 57 Bl 6 -Mäusen induziert (17). Zur Transplantation wurden die MCAF-Tumoren exzidiert, anschließend mit Pinzetten zerzupft und dann die Partikel für 30 Minuten in einer 0,25 %igen Kollagenaselösung bei 37° C suspendiert. Die isolierten Zellen wurden gewaschen, je 10^5 Zellen wurden in die Flanke nicht vorbehandelter Mäuse implantiert. Nach 7 bis 10 Tagen entwickelte sich ein kleiner Tumor, der in den folgenden 4 Wochen bis zu 7 Gramm schwer wurde. Die Tiere starben nach 30 bis 35 Tagen an Tumorkachexie.

Die MCAF3-Zellen wuchsen in einschichtiger Gewebekultur in Plastikflaschen. Als Medium wurde hierbei RPMI 1640 mit 10 %igem fetalen Kälberserum verwendet. Die t_2 der Zellen betrug 19 Stunden. Durch Trypsinisation der Zellen erfolgte die Aufteilung der Kulturen zur Vermehrung und Weiterzucht. Als Kontrollzellen wurden Fibroblasten von C 57 Bl 6 -Mäusen verwendet.

Antigenpräparation:

Zellfreie MCAF3-Antigenextrakte aus syngenen Material wurden nach einer modifizierten Methode nach Meltzer et al. hergestellt. Zur Extraktion wurden 10^8 bis 10^9 lebende MCAF-Zellen in eine 3 M KCl-Lösung eingebracht, die mit 0,5 M Kaliumphosphatpuffer auf einen pH von 7,4 eingestellt war (13). Die Suspension wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit eine Stunde lang bei 4° C und 40 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen gepufferte 0,1 M Natriumchloridlösung dialysiert. Durch Membranfiltration wurde die Antigenpräparation sterilisiert. Der Eiweißgehalt wurde gemessen und auf 1 mg/ml eingestellt.

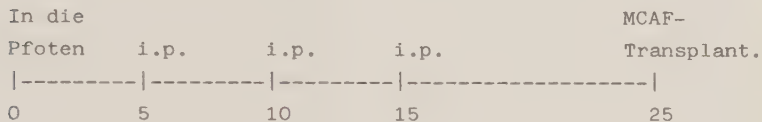
Unlösliches Antigen wurde nach der Methode von Avrameas et al. (1) durch Vernetzung des 3 M KCl-Extraktes hergestellt: zu 20 mg lyophilisiertem Extrakt, der in 0,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0 gelöst war, wurde unter dreistündigem ununterbrochenem Rühren 0,2 ml 2,5 %iger Glutaraldehyd zugegeben. Das Gel wurde mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator in 20 ml Phosphatpuffer homogenisiert. Die Suspension wurde 15 Minuten lang bei 3 000 Upm und 4° C zentrifugiert; diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sediment lyophilisiert und bei -20° C aufbewahrt.

Immunisierung der Mäuse:

Eine erste Gruppe von Mäusen wurde mit kompletten, hitzebehandelten MCAF3-Zellen immunisiert. Diese Zellen waren durch Kollagenasebehandlung 3 bis 4 Wochen alter Tumoren gewonnen und die isolierten Zellen 30 Minuten lang bei 56° C inkubiert worden. Die zweite Gruppe wurde durch Injektion von 100 µg lyophilisiertem 3 M KCl-Extrakt aus MCAF3-Zellen immunisiert. Dasselbe Antigen, jedoch mit Glutaraldehyd vernetzt und damit unlöslich gemacht, wurde zur Immunisierung einer dritten Gruppe eingesetzt.

Die Tiere erhielten 10^6 erhitzte (56° C , 30 min) MCAF3-Zellen oder 100 μg löslichen bzw. unlöslichen Antigen-Extrakt in die vier Füße. Anschließend erhielten die Tiere drei intraperitoneale Injektionen mit 10^6 MCAF3-Zellen oder mit 100 μg löslichem bzw. unlöslichem Antigen-Extrakt in Zeitabständen von 5 Tagen:

Abb. 1: Immunisierungsplan



Die Kontrollgruppen erhielten erhitzte Fibroblasten (56° C , 30 min) oder Extrakte aus Fibroblasten.

Zehn Tage nach der letzten Antigen-Injektion wurden 10^5 lebende MCAF3-Zellen auf die immunisierten Tiere transplantiert. In dreitägigen Abständen wurde das Tumorstadium durch Ausmessen des Durchmessers in zwei Ebenen ermittelt. Die Mittelwerte der beiden Durchmesser sind in den Ergebnissen aufgeführt.

Ergebnisse

Tumorstadium nach in vivo Immunisierung

Das Ergebnis der Tumortransplantation auf je 20 Mäuse, die mit hitzebehandelten MCAF3-Zellen bzw. insolubilisiertem MCAF3-Extrakt immunisiert worden waren, sowie der Transplantation auf eine Kontrollgruppe ist in Abb. 2 und 3 und in Tab. 1 wiedergegeben.

Da die drei Kontrollgruppen bezüglich Tumorstadium und Absterbekurven keine verwertbaren Unterschiede zeigten, wurde in den Ergebnissen exemplarisch das Verhalten der mit hitzebehandelten Fibroblasten immunisierten Gruppe wiedergegeben.

Alle 20 Kontrolltiere entwickelten bis zum 6. Tag nach Transplantation einen Tumor. Der größte Durchmesser wurde nach 24 Tagen mit 1,7 cm erreicht, 4 Tiere starben bis zum 27. Tag, weitere 7 bis zum 31. Tag und weitere 5 bis zum 33. Tag. Die restlichen 4 Tiere verstarben bis zum 36. Tag. Die mittlere Überlebenszeit betrug 28 Tage.

Von den 20 Mäusen, die mit hitzebehandelten MCAF3-Zellen behandelt worden waren, waren 8 Tiere Regressoren, d.h. das Tumortransplantat ging bei diesen Tieren nicht an, bei den restlichen 12 Progressortieren war das Tumorstadium deutlich verlangsamt. Der größte Durchmesser war mit 0,9 cm nach 33 Tagen erreicht. Zu diesem Zeitpunkt starb ein Tier. 36 Tage nach Transplantation waren noch 7 von den 12 Progressortieren am Leben, die mittlere Überlebenszeit betrug 40 Tage.

Bei den Mäusen, die mit unlöslichem Extrakt immunisiert worden waren, stießen 6 Tiere das Tumortransplantat ab. Bei den 14 Progressortieren zeigte sich dieselbe Tumorstadiumskurve wie bei der vorangegangenen Gruppe beschrieben. Am 30. Tag wurde mit 1,1 cm der größte Tumor-

durchmesser ermittelt. Zwei Mäuse starben am 33. Tag, vier weitere bis zum 36. Tag, die übrigen Tiere starben bis zum 44. Tag. Die mittlere Überlebenszeit betrug 41 Tage.

Löslicher 3 M KCl-Extrakt hatte im Vergleich zu den Kontrolltieren keinen Einfluß auf das Tumorstadium, d.h. größter Tumordurchmesser, mittlere Überlebenszeit und Wachstumskurve waren identisch mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe.

Die Absterbekurven der einzelnen Versuchsgruppen sind in Abb. 4 dargestellt.

Diskussion

Aus der Literatur ist bekannt, daß durch Immunisierung mit MCAF das Wachstum von transplantierten MCAF-Tumoren verhindert werden kann (6).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führte die Immunisierung von Mäusen mit erhitzten MCAF-Zellen in einem Teil zur Unterdrückung des Tumorstwachstums im Sinne von Regression. In einem anderen Teil entwickeln sich Tumoren; bei Vergleich der Wachstumskurven fällt bei den vorimmunisierten Tieren eine Verzögerung des Tumorstwachstums auf. Auch die Tumorstgröße, gemessen am Durchmesser, ist vermindert, und die Überlebenszeit der vorimmunisierten Progressortiere ist verlängert. Mäuse, die mit einem insolubilisierten Extrakt aus Membranen von MCAF-Zellen immunisiert wurden, zeigen ein vergleichbares Verhalten wie die Mäuse, die mit erhitzten MCAF-Zellen vorbehandelt wurden. Demgegenüber zeigen Mäuse, die mit löslichen Extrakten immunisiert wurden, eine Wachstumskurve, die jener der Kontrolltiere entspricht. Insgesamt zeigen die Versuche, daß syngene MCAF-Tumorzellen und insolubilisierete Extrakte aus Oberflächenmembranen syngener Tumorzellen gleiche Abwehrmaßnahmen gegenüber Tumoren bei Mäusen hervorrufen.

Bei Abwehrreaktionen gegenüber Tumoren, die nach Immunisierung mit Tumorzellen bzw. Tumorextrakten auftreten, geht man von der Vorstellung aus, daß es sich um die Induktion immunologischer Reaktionen handelt, die gegen spezifische Antigene der Oberflächenmembran von Tumorzellen gerichtet sind und das Wachstum transplantierte Tumorzellen beeinflussen (2,3,5,8,12,15,16). Um den Nachweis derartiger spezifischer Antigene zu ermöglichen, wurden in der Literatur wiederholt Immunisierungen mit löslichen Extrakten aus Tumorzellmembranen vorgenommen. Diese führten, wie auch in unseren Experimenten, in der Regel nicht zu einer Beeinträchtigung des Tumorstwachstums. Häufiger wurde sogar eine Beschleunigung des Tumorstwachstums im Sinne von Enhancement (4,9,11) beobachtet.

Immunisierungsversuche wurden deshalb in der Regel mit Tumorzellen oder Tumorzellpartikeln ausgeführt.

Die Tatsache, daß lösliche Extrakte von Oberflächenmembranen der Tumorzellen nicht zu einer Aktivierung der Tumorabwehr führen, warf die Frage auf, ob überhaupt Tumorantigene in diesen Extrakten vorkommen, d.h. ob durch die besondere Präparation der löslichen Tumorantigene die Immunogenität zerstört wurde. Aus zahlreichen Versuchen ist bekannt, daß partikuläre Antigene höhere Immunogenität besitzen als lösliche Antigene. Es wurde daher versucht, durch Glutaraldehydvernetzung die mittels hypertoner Salzlösung aus der Oberflächenmembran von Tumorzellen extrahierten Proteine und Peptide unlöslich zu machen und damit eventuell Immunogenität wiederherzustellen.

Tatsächlich zeigten die vernetzten Oberflächenproteine ähnliche Effekte bei der Induktion der Tumorabwehr wie intakte oder erhitzte Tumorzellen. Die Frage allerdings, ob die verbesserte Tumorabwehr auf einer Immunisierung gegen spezifische Antigene beruht oder ob es sich um einen unspezifischen Adjuvanseffekt handelt, kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht beantwortet werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob durch Fraktionierung der löslichen Extrakte und anschließende Insolubilisierung Fraktionen erhalten werden können, welche die Tumorabwehr unterschiedlich beeinflussen. Insofern ermöglichen die vorgelegten Experimente neue Ansätze, Oberflächenproteine auf ihre Wirksamkeit in der Tumorabwehr zu untersuchen.

TUMORWACHSTUM NACH IN VIVO IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN

1. In vivo Immunisierung von C 57 Bl 6 -Mäusen mit 4 Injektionen (Seite 5, Abb. 1)
von MCAF3-Antigenen in fünftägigen Abständen
2. Transplantation von 10^5 MCAF-Zellen 10 Tage nach der letzten Injektion
3. Bestimmung des Tumor-Durchmessers in 2 Ebenen in 3-tägigen Abständen

TUMORWACHSTUM BEI 20 IMMUNISIERTEN UND KONTROLL - MÄUSEN NACH TRANSPLANTATION VON 10⁵ MCAF - ZELLEN

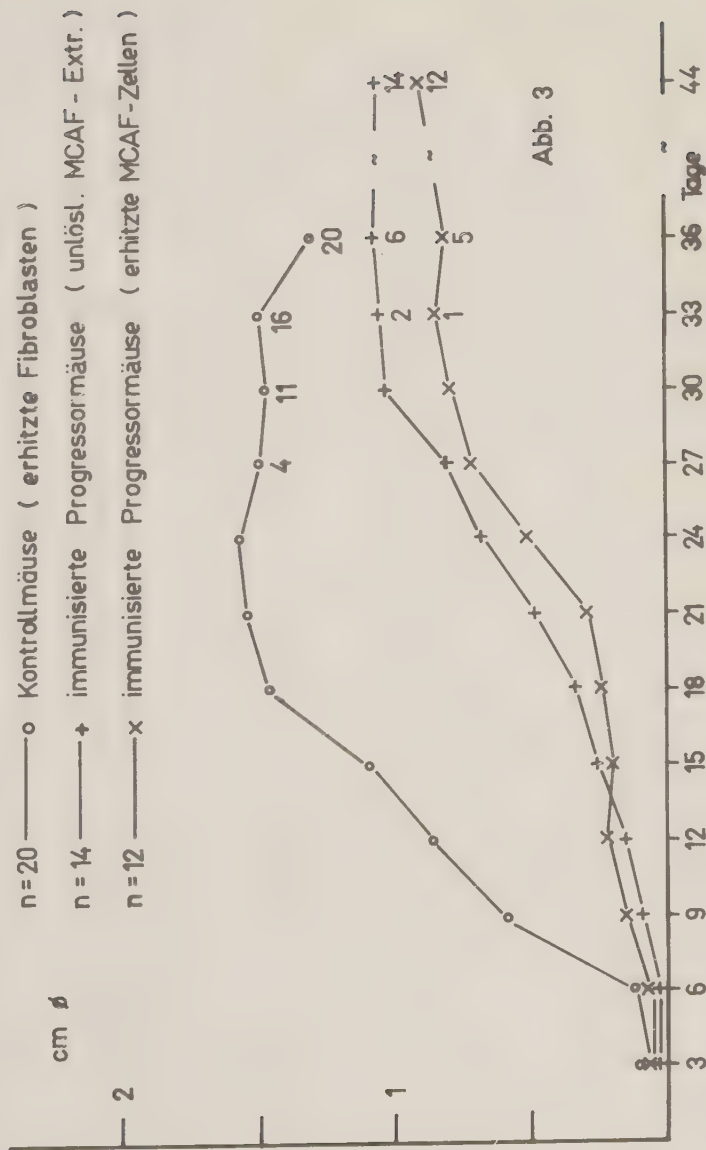


Abb. 3

Abb. 4

ABSTERBEKURVE DER PROGRESSORMÄUSE



Tabelle 1

WACHSTUM VON MCAF-TUMOREN BEI C 57 BL 6-MÄUSEN NACH TRANSPLANTATION
VON 10^5 TUMORZELLEN

Anzahl der Mäuse	immunisiert gegen	Regressor / Progressormäuse	mittlere Überlebenszeit der Progressor - Mäuse
20	hitzebehandelte Fibroblasten	0 / 20	28 Tage
20	hitzebehandelte MCAF - Zellen	8 / 12	40 Tage
10	3 M KC1 - Extrakt aus MCAF - Zellen	0 / 10	26 Tage
20	unlöslich gemachter Extrakt aus MCAF - Zellen	6 / 14	41 Tage

Zusammenfassung

In den vorliegenden Experimenten wurde untersucht, ob Mäuse Tumorzelltransplantate nach Immunisierung mit löslichem bzw. insolubilisiertem Extrakt aus der Oberflächenmembran von Tumorzellen abstoßen.

Mäuse des Inzuchtstammes C 57 Bl 6 wurden gegen hitzebehandelte Tumorzellen syngener, Methylcholanthren-induzierter Fibrosarkome immunisiert. Eine zweite Gruppe wurde gegen in hypertoner Salzlösung extrahierte Tumorzellmembranproteine und eine dritte Gruppe gegen durch Glutaraldehyd unlöslich gemachte Tumorzellmembranproteine sensibilisiert. Nach Abschluß der Immunisierungsperiode wurden den Tieren lebende Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkomzellen transplantiert.

Kontrolltiere und mit löslichem Extrakt vorbehandelte Tiere entwickelten progressiv wachsende Tumoren. Die mittlere Überlebenszeit betrug bei der Kontrollgruppe 28 Tage bei einer maximalen Überlebenszeit von 36 Tagen. Tiere, die mit hitzebehandelten Tumorzellen bzw. mit insolubilisiertem Tumorzellextrakt behandelt worden waren, stießen in mehr als 30% die Fibrosarkomtransplantate ab. Die restlichen Progressortiere hatten mittlere Überlebenszeiten von 40 bzw. 41 Tagen.

Auch die Tumorgroße zeigte deutliche Unterschiede. Bei den Kontrolltieren und den mit löslichem Extrakt behandelten Tieren wurden Tumoren mit wesentlich größerem Durchmesser beobachtet als bei den Mäusen, die mit hitzeinaktivierten Fibrosarkomzellen bzw. insolubilisierten Tumorzellextrakten vorbehandelt worden waren.

Die vorgelegten Ergebnisse sprechen dafür, daß Tumorstadium durch Vorimmunisierung mit insolubilisiertem Extrakt aus Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomzellmembranen in gleicher Weise gehemmt bzw. unterdrückt werden kann, wie es durch hitzeinaktivierte Tumorzellen gelingt. Die Frage, inwieweit es sich hierbei um einen spezifischen Effekt handelt, muß weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

Literaturverzeichnis

1. Avrameas, S., Ternynck, T.:
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and
its use for the preparation of immunoadsorbents.
Immunochemistry 6 (1969), 53
2. Baldwin, R.W.:
Role of immunosurveillance against chemically
induced rat tumors.
Transplant. Rev. 28 (1976), 62
3. Baldwin, R.W.:
Tumor-associated antigens.
Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie
89 (1977), 1
4. Baldwin, R.W., Embleton, M.I., Price, M.R.:
Inhibition of lymphocyte cytotoxicity for human colon
carcinoma by treatment with solubilized tumor membrane
fractions.
Int. J. Cancer 12 (1973), 84
5. Baldwin, R.W., Harris, J.R., Price, M.R.:
Fractionation of membrane-associated tumorspecific
antigen from an aminoazo-dye induced rat hepatoma.
Int. J. Cancer 11 (1973), 385
6. Boyse, E.A., Old, L.J., Oettgen, H.F.:
Tumor Immunology.
in P.A. Miescher - H.J. Müller-Eberhard: Textbook of
Immunopathology, Vol. II, Grune & Stratton, New York (1976)

7. Ferni, G., Comoglio, P.M.:
Effect of solubilized membrane antigens and tumor
bearer serum on tumor growth in syngenic hosts.
Br. J. Cancer 30 (1974), 365
8. Foley, E.J.:
Antigenic properties of methylcholanthrene-
-induced tumors in mice of the strain of origin.
Cancer Res. 13 (1953), 835
9. Hellström, K.E., Hellström, I.:
Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum
activity to tumor antigens.
Adv. Immunol. 16 (1974), 204
10. Herbermann, R.B., Aoki, T., Nunn, M.E.:
Solubilization of G (Gross) antigens on the surface
of G leukemia cells.
J. Natl. Cancer Inst. 50 (1973), 481
11. José, D.G., Cooper, W.C., Good, R.A.:
How protein deficiency enhances cellular immunity.
J. Amer. Med. Ass. 218 (1971), 1428
12. Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E., Hellström, K.E.:
Demonstration of resistance against methylcholanthrene-
-induced sarcomas in the primary autochthonous host.
Cancer Res. 20 (1960), 1561
13. Meltzer, M.S., Leonard, E.J., Rapp, H.J., Borsos, T.:
Tumor-specific antigen solubilized by hypertonic
potassium chloride.
J. Nat. Cancer Inst. 47 (1971), 703
14. Pilch, Y.H.:
The antigenicity and immunogenicity of cell-free
extracts of chemically induced murine sarcomas.
Cancer Res. 28 (1968), 2502

15. Prehn, R.T.:
Specific isoantigenicities among chemically
induced tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101 (1962), 107
16. Prehn, R.T., Main, J.H.:
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcoma.
J. Nat. Cancer Inst. 18 (1957), 759
17. Warnatz, H.:
Studies on non T-cell dependent immune response
to syngenic tumor target cells.
Cell. Immunol. 17 (1975), 517

Herrn Prof. Dr. J.R. Kalden danke ich für die
Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. H. Warnatz,
der mir das Thema überließ und mit Rat und Tat stets
hilfreich zur Seite stand.

Für das gute Arbeitsklima und die freundliche
Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern
des immunologischen Labors.

Hans Mosberg,

Kellergasse 30
7910 Neu-Ulm-Pfuhl

Lebenslauf

Am 9. August 1952 wurde ich in Schwenningen als Sohn des verstorbenen Journalisten Hans Mosberg und seiner Ehefrau Rosa Mosberg, geb. Schott, geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Nördlingen, wo ich im Herbst 1959 auch eingeschult wurde und 1963 in das Theodor-Heuss-Gymnasium übertrat. Meine Schulzeit schloß ich dort 1972 mit dem Abitur ab und wurde anschließend als Stipendiat in die Stiftung Maximilianeum aufgenommen.

Ab dem Wintersemester 1972 studierte ich Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen und wurde dort während des ersten Semesters Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes. Die ärztliche Prüfung legte ich am 11. Mai 1979 ab, die Approbation als Arzt wurde mir am 25. Mai 1979 erteilt.

Ab 1. Juni 1979 verpflichtete ich mich als Soldat auf Zeit für vier Jahre, bis 31. Mai 1981 war ich Stabsarzt in der chirurgischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Amberg. Anschließend wechselte ich in das Bundeswehrkrankenhaus Ulm, wo ich bis jetzt in der medizinischen Abteilung als Oberstabsarzt tätig bin.

Seit 4. August 1978 bin ich mit Christine Mosberg, geb. Brock, verheiratet, unsere Tochter Valerie wurde am 23. Januar 1979 geboren.

